

بررسی اثر ضد زالو عصاره متانولی تنباکو (*Nicotina tabacum*) در مقایسه با سوکسینیل و چند داروی ضد انگل

محمود بهمنی^{۱*}، دکتر سید رضا حسینی^{**}، دکتر مجید آویژگان^{***}، مصطفی قربانی[†]

^{*}دانش آموخته دکتری دامپزشکی - عضو باشگاه پژوهشگران جوان - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ^{**}استادیار گروه پاتوبیولوژی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ^{***}استاد گروه عفونی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، [†]آمربی گروه بهداشت و دانشجوی دکترای اپیدمیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی گلستان. تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۴ تاریخ تایید: ۸۹/۴/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف: زالوها جزء راسته آنالیدا هستند که ۵۰ نوع از آن از خون پستانداران تغذیه می کنند. آلودگی به زالو باعث عوارضی شامل: کم خونی شدید، خونریزی، افزایش حساسیت و واکنش آنافیلاکتیک می شود. این مطالعه با هدف بررسی اثر تعدادی از داروهای شیمیایی و گیاهی بر زالو گونه لیمناتیس نیلوتیکا انجام شد. روش بررسی: در این مطالعه تجربی ابتدا تعداد ۱۰۰ عدد زالو از جنس لیمناتیس نیلوتیکا تهیه و اثر عصاره متانولی تنباکو و داروهای مبندازول، سوکسینیل کولین، مترونیدازول، تریکلاندازول، لومامیزول، نیکلوزاماید و یک تیمار با آب مقطر بر زالو مطالعه شد. حرکات و اثرات داروها به مدت ۷۲۰ دقیقه مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت و زمان فلجی و مرگ زالو ثبت می گشت. یافته ها: با بررسی فلجی و مرگ زالو مشخص شد عصاره متانولی تنباکو با دوز ۶۰۰ میلی گرم با میانگین ۱۷ دقیقه باعث مرگ زالوها می شود. داروهای تریکلاندازول با میانگین ۱۱۸/۶۶ دقیقه، لومامیزول با ۷ دقیقه، نیکلوزاماید با ۱۸/۶۶ دقیقه و مترونیدازول با ۵۴۱/۱۱ دقیقه باعث مرگ زالوها شدند. نتیجه گیری: میانگین زمانی نسبتاً کوتاه فلجی و مرگ زالو توسط عصاره متانولی تنباکو و داروهای لومامیزول، نیکلوزاماید، تریکلاندازول نشان از اثرات ضد زالویی این داروها می باشد و ممکن است بتوان از آنها در موارد آلودگی انسانی با زالو گونه لیمناتیس نیلوتیکا استفاده نمود.

واژه های کلیدی: زالو، لیمناتیس نیلوتیکا، داروهای ضد انگل، تنباکو.

مقدمه:

خون پستانداران تغذیه می کنند که اهمیت انگلی زالوها را نشان می دهد، گونه های با اهمیت پزشکی و دامپزشکی زالو شامل: لیمناتیس نیلوتیکا (*Limnatis nilotica*)، همادپسا زیلاتیکا (*Haemadipsa zylatica*)، همادپسا سیلسترینس (*Haemadipsa sylvestris*)، همادپسا پیکتا (*Hamadipsa picta*)، میکسوبدلا آفریکانا (*Myxobdella africana*)، دینوبدلا فروکس (*Dinobdella ferox*)، فیتوبدلا کاتنیفرا (*Phytobdella catenifera*) و ترومیزون تسولاتوم (*Teromyzon tessulatom*) می باشند. زالوها در درمان برخی بیماری ها نیز کاربرد ویژه ای دارند (۱). همچنین به عقیده بعضی از کارشناسان ۱۰۰ نوع ماده ویژه با اثرات درمانی گوناگون با گزش زالو در خون

زالو جانور انگلی از راسته آنالیدا است. تعدادی از زالوها آبی اند و در شالیزارها، مرداب ها، رودخانه و دریاچه های آب شیرین زندگی می کنند و تعدادی نیز خاکاری اند. زالوها جانوران لاشه خوار، شکاری یا انگلی بوده و گروهی دارای عادت خونخواری هستند. زالوی خونخوار توسط بادکش و با یک گزش بدون درد به پوست و سایر ارگان های داخلی بدن مانند دهان، گلو، نای، واژن، و چسبیده، پوست یا مخاط آن را سوراخ و یک آنزیم ضد انعقاد به نام هیرودین آزاد کرده و از خون میزبان استفاده می کند (۳-۱) در یک وعده غذایی هر زالو ۵ تا ۱۵ میلی لیتر خون می مکد (۳-۱). جانور شناسان تاکنون ۶۵۰ نوع زالو را شناسایی کرده اند که ۵۰ نوع از آنها از

^۱نویسنده مسئول: شهرکرد- رحمتیه - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد-تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۶۱۰۴۵، E-mail:mahmood.bahmani@gmail.com

ترشح می شود که مورد توجه پزشکان و جراحان قرار گرفته است و در اروپا و آمریکا در موارد گرفتگی رگ های قلب، گرفت های پوست، زیبایی پوست، جراحی قلب، پیوند اعضا و تقویت سیستم دفاعی بدن از آن استفاده می شود (۵،۴). محققین معتقدند هر گونه کانون عفونی بدن را بوسیله زالو می توان ریشه کن کرد، ولی در بحث انگلی زالوها می توانند باعث عوارض زیادی شوند (۵،۴). در عین حال که زالوها اثرات درمانی مفیدی دارند ولی می توانند به عنوان یک انگل آسیب رسان باعث عوارضی شامل: کم خونی شدید، خون ریزی کوتاه مدت، افزایش حساسیت و حتی واکنش آنافیلاکتیک گردند (۴،۱). کمتر پزشکی در ایران است که در مناطق روستایی و دور افتاده طبابت کرده باشد و با پدیده زالو به عنوان جسم خارجی در بینی، نازوفارنکس، حلق و حنجره و حتی دستگاه تنفس چندان آشنایی نداشته باشد (۶). زالوها انگل انسان، دام، ماهی ها، لاک پشت ها، حلزون ها، کرم های خاکی، قورباغه ها، لارو حشرات بوده و از آنها تغذیه می کنند و پتانسیل انگلی زالو در حدی بالاست که حتی لجن های کف استخر از حمله زالوها در امان نیستند (۴،۳،۱). مواردی گزارش شده است که افراد مجروح یا مفقود در جنگل از حمله هزاران زالو از این نوع از پا درآمده اند. آلودگی زالو در حلق با نوشیدن آب های آلوده و تصفیه نشده و سایر منافذ که با آب در تماس هستند وارد بدن شده و سپس خود را در غشای مخاطی مناطقی مثل حلق، حنجره، ملتحمه، بینی، نای، نایژه، روده، واژن و رکتوم مستقر و برای مدت طولانی در آنجا باقی مانده و سبب کم خونی شدید می شوند. آلودگی حلقی و راه های هوایی با زالو و لیمناتیس نیلوتیکا در بچه ها کم خونی های شدیدی ایجاد می کند (۴،۱). آلودگی هایی در ایران در گوسفند با لیمناتیس نیلوتیکا همچنین در مورد آلودگی گاو (۷)، الاغ و سگ گله (۸) و همچنین در انسان آلودگی در چشم (۹)، واژن (۱۰)، گلو (۱۱)، دستگاه گوارش در کودکان گزارش شده است (۱۲). در مورد آلودگی در سایر نقاط دنیا آلودگی انسان با لیمناتیس پالودا

(*Limnatis paluda*) به عنوان انگل تنفسی از عربستان سعودی (۳) و آلودگی یک دختر ۵ ساله از یک منطقه شهری در دریای اژه با لیمناتیس نیلوتیکا و آلودگی با زالو در چشم یک کودک با تاریخچه شناکردن در رودخانه گزارش شده است (۱۳). گزارشات واصله از آلودگی انسانی و دامی نشان از نوظهور و نوپدید بودن زالو به عنوان بیماری مشترک انگلی بین انسان و دام است. در حال حاضر درمان آلودگی با زالوها صرفاً سنتی هستند به عنوان مثال پوشیدن جوراب (وقتی پاها در معرض خطر حمله باشند)، قرار دادن باقیمانده خشک شده صابون حمام به محل گزش، گذاشتن برگ های تنباکو بین انگشتان پنجه پا، گذاشتن مقداری نمک یا جوش شیرین، عصاره مرکبات، روغن اکالیپتوس، شستن محل گزش با آب و صابون، استفاده از کیسه آب یخ و سرد کردن محل جهت کاهش درد و تورم، استفاده از آنتی هیستامین برای کاهش خارش و التهاب و حتی استفاده از هیدروکسید کلسیم که باعث آسیب و سوزش بافتی می گردد (۴،۱)، از درمان های سنتی هستند که مردم فرهنگ های مختلف دنیا در موارد آلودگی با زالو استفاده می کنند ولی درمان های موثری نیستند. تنباکو با نام علمی *Nicotina tabacum* از خانواده Solanaceae که به علت وجود ماده ای به نام نیکوتین از گیاهان سمی بوده و تقریباً اثرات ضد انگلی آن روی تعداد زیادی از انگل ها به اثبات رسیده است (۱۴).

با توجه به اینکه گیاهان دارویی و فرآورده های طبیعی عوارض کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند (۱۴) و می تواند در درمان و کاهش عوارض زالو موثر واقع شود، لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره متانولی تنباکو و داروهای شیمیایی بر زالو گونه لیمناتیس نیلوتیکا انجام گرفت.

روش بررسی:

تهیه و شناسایی زالو:

طی ۵ مسافرت صحرایی به مناطق روستایی جنوبی استان ایلام تعداد ۱۰۰ زالو تهیه شد. زالوها در

(۱۰۰ میکرولیتر) استفاده گردید. دوزهای مورد نظر هر تیمار توسط ترازوی حساس وزن نموده و پس از حل نمودن در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر و لرم به عنوان حلال به ظرف آزمایش اضافه می گشت (۱۶، ۱۷).

از آنجایی که در بحث درمان زالوها مطالعه دارویی صورت نگرفته است از دوزهای استاندارد استفاده گردید. برای هر دارو ۹ تکرار در نظر گرفته شد. آزمایش ضد انگلی و اثرات کشندگی داروها و عصاره بر اساس ۱۲ ساعت (۷۲۰ دقیقه) طراحی گردید. از زمانی که دارو به ظرف اضافه می شد زمان توسط زمان سنج ثبت می گشت.

انجام آزمایش:

از آنجایی که هیچ روش کار علمی In-vitro و In-vivo برای بررسی اثرات ضد زالویی داروهای شیمیایی و گیاهی روی زالو وجود نداشت. همچنین هیچ گونه منبعی دال بر مطالعه مشابه جهت الگو برداری یافت نشد. مدل آزمایشگاهی اساتید بخش عفونی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اساتید بخش انگل شناسی و فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد طراحی و اجراء گردید. به همین منظور ابتدا در ظروف شیشه ای شفاف (جهت مشاهده دقیق زالوها) درب دار، سوراخی به قطر حدود ۵۰/۵ سانتی متر (به منظور اکسیژن رسانی) تعبیه شد و میزان ۶۰۰ میلی لیتر آب چشمه هایی که زالو از آن جمع آوری شده بود اضافه گردید. به هر ظرف تعداد یک عدد زالو اضافه شد و همزمان با اضافه نمودن داروها تمامی حرکات به دقت ثبت شد. برای هر تیمار ۹ تکرار در نظر گرفته شد. اثرات ضد انگلی بر اساس فاکتور فلجی و مرگ مشخص می شود.

فلجی و مرگ: عدم حرکت زالو هنگام تحریک بدن زالو با نوک نیدل است و در حین آزمایش بر حسب دقیقه ذکر می گردد و هر چه زالو در زمان کوتاه تری از اضافه نموده دارو به ظرف آزمایش دچار مرگ شود، دارو موثرتر است.

ظروف شیشه ای درب دار حاوی فرمالین ۱۰ درصد به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت تشخیص گونه منتقل شدند. نمونه ها از فرمالین خارج و با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند. زالوهای جدا شده زیر لوپ (Stereoscope) مورد مطالعات مورفولوژیک قرار گرفتند. با توجه به رنگ سبز تیره، نوار طولی نارنجی رنگ در طرفین بدن، طول حدود ۱۲۰-۱۰۰ میلی متر، آلت مکنده بزرگ در عقب (انتهای) بدن و یک آلت مکنده کوچک تر در جلو بدن، گونه لیمناتیس نیلوتیکا تشخیص داده شد. در این مطالعه از زالوهایی به طول ۵۰-۷۰ میلی متر برای آزمایش استفاده شد.

تهیه، شناسایی عصاره گیری گیاه تنباکو:

به منظور اجرای این مطالعه تجربی خردادماه سال ۱۳۸۸ گیاه تنباکو از استان ایلام خریداری و در مرکز تحقیقات منابع طبیعی استان ایلام، تأیید جنس و گونه گردید.

در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد از گیاه تنباکو عصاره متانولی تهیه گردید. ابتدا گیاه تنباکو توسط دستگاه میکسر (Molinox® Italy) پودر گردید و میزان ۵۰ گرم پودر گیاهی با ۳۰۰ میلی لیتر متانول به مدت ۴۸ ساعت در پروکولاتور خیسانده شد. به منظور افزایش استخراج مواد موثره به مدت ۳ ساعت بر روی تکان دهنده (Shaker) گذاشته شد و به منظور به تقلیل رساندن حجم عصاره ی تهیه شده با استفاده از روش تقطیر در خلاء (Zirbus302® Germany) ابتدا الکل موجود در عصاره الکلی خارج گردید و به مدت ۴۸ ساعت در آون ۵۰ درجه پودر خشک عصاره متانولی تهیه گردید.

تهیه سوسپانسیون داروهای ضد انگل:

داروهای شیمیایی لوامیزول، نیکلوزاماید، تریکلاندازول (داملران، ایران) و از داروهای مبندازول (روز دارو، ایران)، سوکسینیل (پرتغال) و مترونیدازول (تهران شیمی، ایران) انتخاب و از دوز پیشنهادی و شکل دارویی استاندارد و تجاری هر شرکت استفاده شد. همچنین از آب مقطر استریل به عنوان گروه پلاسبو

تیمار عصاره متانولی تنباکو +۴ و برای آب مقطر نیز منفی (-) بود.

بحث:

دو نوع زالو در انسان ایجاد بیماری می کند. نوع اول زالوی خاکزی است که دارای فک قوی است و با چسبیدن به پوست و نفوذ در آن آزردهای پوستی ایجاد می کند. نوع دوم زالوی آبی می باشد که فک ضعیف تری دارد و برای رشد نیاز به بافت نرم مثل مخاط دستگاه گوارش دارد و از خون تغذیه می کند. این انگل از طریق دهان و بینی انسان ضمن شست و شوی حلق و بینی یا نوشیدن آب وارد دهان می شود و به نازوفارنکس و اپی گلوت یا ازوفارنکس و حتی تراشه و برونش می چسبد. به همین دلیل زالوی آبی می تواند عوارض بیشتری نسبت به زالوی خاکزی ایجاد کند چرا که سبب آنمی شدیدی می گردد و حتی گاهی نیاز به ترانسفیوژن خون به بیمار می شوند (۱۵). از آنجایی که درمان عوارض آلودگی انسان با زالو صرفاً روش های سنتی و با تاثیر کمی هستند، بنابراین جستجوی راه حلی علمی جهت رفع این مشکل ضروری به نظر می رسد. مطالعه بهمنی و همکاران مویید این موضوع است که داروی لومیزول به سرعت موجب فلجی و دفع لیمناتیس نیلوتیکا از دهان و حلق گوسفندان نژاد کردی می شود. در این مطالعه دامداران سنتی مناطق جنوبی استان ایلام از درمان سنتی شامل خوراندن عصاره تنباکو (تنباکو در آب) استفاده می کنند (۷). مهره داران و بی مهرگان هر دو گروه دارای گیرنده های نیکوتینی با ساختار و فعالیت مشابهی هستند اما می تواند ویژگی های فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی متفاوتی داشته باشد و نیکوتین احتمالاً می تواند موجب صدمه و آسیب سمی در مهره داران شود (۱۸). در طب سنتی دنیا از گیاه تنباکو به عنوان یک داروی ضد اسپاسم، مدر، قی آور، خلط آور، مسکن و بزاق آور استفاده می شود (۱۹). نیکوتین با اثر بر گیرنده استیل-کولین باعث شلی عضلانی می گردد (۱۹). در این مطالعه بروز کشندگی و مرگ زالو احتمالاً از طریق اثر نیکوتین

شدت اثر داروها و تیمارهای دارویی: شدت اثر داروها بر اساس زمان به ۵ رنج تقسیم گردید. چهار مثبت (+۴): فلجی و مرگ زالو بین ۱ تا ۶۰ پس از اضافه نمودن دارو، سه مثبت (+۳): فلجی و مرگ زالو بین ۶۱ تا ۱۲۰ پس از اضافه نمودن دارو، دو مثبت (+۲): فلجی و مرگ زالو بین ۱۲۱ تا ۱۸۰ پس از اضافه نمودن دارو، یک مثبت (+۱): فلجی و مرگ زالو بین ۱۸۱ تا ۲۴۰ پس از اضافه نمودن دارو، منفی (-): فلجی و مرگ زالو بین ۲۴۱ تا ۷۲۰ پس از اضافه نمودن دارو (حتی در موارد مرگ زالو در این دقایق، از لحاظ شدت اثر، منفی محسوب می گردد).

داروهایی که در بازه زمانی ۶۰-۱ (شدت اثر +۴) موجب مرگ زالو گردد به عنوان داروهای پر قدرت و موثر بر زالوی گونه لیمناتیس نیلوتیکا در نظر گرفته شد. جهت آنالیز داده ها، از آزمون کروسکال والیس استفاده شد.

یافته ها:

تاثیر مثبت داروها (فلجی و مرگ) به دلیل اثر دارو بر آنزیم فومارات ردوکتاز، سوکسینات دهیدروژناز، وقفه در فسفوریلاسیون اکسیداتیو و تجمع اسید لاکتیک در بدن انگل و مرگ انگل مشخص می گردد (۱۳).

هر چه زالو در زمان کوتاه تری دچار مرگ شود نشان دهنده اثر بهتر دارو است. در این مطالعه بهترین داروها به ترتیب لومیزول ($7 \pm 3/6$ دقیقه) و پس از آن عصاره متانولی تنباکو ($172 \pm 6/11$ دقیقه)، نیکلوزاماید ($18/66 \pm 5/70$ ، تریکلاندازول ($118/66 \pm 105/05$) و مترونیدازول ($541/11 \pm 268/49$ دقیقه) مشخص گردید.

تیمارهای مبندازول، سوکسینیل کولین و آب مقطر به عنوان داروهای بی اثر مشخص گردیدند. بر اساس آزمون کروسکال والیس بین تیمارهای مختلف از نظر میانگین مدت زمان مرگ زالو (دقیقه) اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0/01$). شدت اثر داروها به ترتیب شامل مبندازول منفی (-)، سوکسینیل منفی (-)، مترونیدازول +۱ و برای تریکلاندازول، لومیزول، نیکلوزاماید +۴،

موجود در عصاره گیاه تنباکو بر گیرنده های نیکوتینی اعمال شده است. داروی تریکلاندازول فعالیت آنزیم فومارات ردوکتاز را در سستوها مهار می کند، بدون اینکه تاثیر سویی بر میزبان داشته باشد در نتیجه اعمال متابولیکی و تولید انرژی را در انگل مختل می نماید. داروی لوامیزول از طریق مهار آنزیم های فومارات ردوکتاز و سوکسینات دهیدروژناز باعث فلج کرم های انگلی می گردد. داروی نیکلوزاماید با وقفه در جذب و جفت شدن مرحله فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری سلول های کرم و به واسطه متوقف کردن سیکل کربس، موجب تجمع اسید لاکتیک در بدن انگل شده و باعث مرگ انگل می گردد (۱۸). مترونیدازول در داخل میکروب های غیر هوازی و سلول های پروتوزوئی حساس، گروه ازت آن از طریق فرودوکسین احیاء می گردد. همچنین محصولات احیاء شده از طریق واکنش با ماکرومولکول های داخل سلولی مسئول کشتن سلول ها می باشد (۱۷). تاثیر مناسب ضد زالویی داروهای تریکلاندازول، لوامیزول، مترونیدازول و نیکلوزاماید بر زالو احتمالاً از طریق مکانیسم های ذکر شده صورت می گیرد که برای اثبات این ادعا نیاز به مطالعات تکمیلی می باشد. سوکسینیل کولین با اثر بر گیرنده های نیکوتینی باعث باز شدن کانال یون سدیم و دپلاریزاسیون صفحه انتهایی می گردد و گسترش این دپلاریزاسیون در غشاهای مجاور باعث انقباض ناهماهنگ و عمومی واحدهای حرکتی عضله می گردد. همچنین مکانیزم اثر سوکسینیل کولین در روند تحریک-انقباض مستلزم رپولاریزاسیون صفحه انتهایی و تحریک مکرر برای حفظ تونوس عضله است که نتیجه اش یک فلجی شل برای انگل می باشد (۱۷). اثرات سرطان زایی و موتاسیون زایی نیکوتین ثابت نشده است (۲۰).

تریکلاندازول از داروهای ضد انگلی است که در موارد آلودگی انسان با انگل فاسیولا هپاتیکا و انگل های تنفسی خانواده پاراگونیموس به کار می رود (۲۶-۲۱). با توجه به زمان مناسب فلجی و مرگ داروهای لوامیزول، نیکلوزاماید، تریکلاندازول و عصاره متانولی تنباکو بر زالو و هم خوانی اثرات ضد انگلی مناسب داروهای این مطالعه با مطالعات قبلی می توان از داروهای ذکر شده به عنوان داروی ضد زالو با اثر مناسب استفاده نمود.

نتیجه گیری:

این مطالعه شاید اولین مطالعه بررسی اثرات ضد زالویی گیاه دارویی و داروی شیمیایی در دنیا باشد. با توجه به نتایج مطلوب بدست آمده، مطالعه فوق می تواند آغاز راهی برای پژوهش های آینده باشد. با توجه به اثرات کشندگی داروهای لوامیزول، نیکلوزاماید، تریکلاندازول، مترونیدازول، گیاه تنباکو و نیکوتین همچنین طبیعی بودن تنباکو لازم است مطالعات دقیق تر فارماکولوژیکی بر روی ماده موثره، نحوه و مکانیسم اثر گذاری داروهای این مطالعه صورت گیرد تا بتوان دارویی موثر و بی خطر علیه زالو در جهان ارائه نمود.

تشکر و قدردانی:

از باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بابت تامین هزینه مطالعه فوق تشکر می گردد. از اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر رفیعان، دکتر بهنام مشگی و دکتر حجت الله روحی بروجنی قدردانی می گردد. همچنین از آقای فریدون قطیان بابت مساعدت در جمع آوری زالو تشکر می شود.

منابع:

1. Madill J, Hovingh P. Freshwater leech (Annelida: Hirudinea) distribution in the Canadian province of Newfoundland and Labrador and adjacent regions: check-list, new records, new pigmentation forms, and Pleistocene refugia. Zootaxa. 2007; 1657: 1-21.

2. Hovingh P, Clark WH, Keebaugh J. Leeches of the Snake River in Idaho and Oregon: paleodrainage implications of mooreobdella microstoma. Western North Am Naturalist. 2008; 68(2): 210-24.
3. Agin H, Ayhan F, Gulfidan G, Cevik D, Derebsi H. Severe anemia due to the pharyngeal leech *Limnatis nilotica* in a child. *Turkiye Parazitolo Derg.* 2008; 32(3): 247-8.
4. Schenkova J, Sychra J, Kubova N. The freshwater leeches (Clitellata: Hirudinida) of the Czech Republic - list of taxa and remarks on rare and endangered species. *Kotlarska.* 2005; 2(6): 11-37.
5. Readell AM, Philips CA, Wetzel MR. Leech parasitism in a turtle assemblage: effects of host and environmental characteristics. *Revue.* 2008; 1: 227-33.
6. Hossein Nia AH. Leech in the respiratory system: report of Sistan and Baluchestan. *Magazine of Doctors and Pharmacists of Ilhnic.* 1991; 2(1): 11-12.
7. Bahmani M, Zamani P, Meshgi B, Abdi Zadeh R. [The first report infestation in sheep at *Limnatis nilotica* in Iran, Sixth National Conference and The First Regional Congress of Parasitology and Parasitic Diseases. Karaj-Iran. 2008 7-9Jun; p: 384.]Persian
8. Mehrzadi S, Razi Jalali MH, Bahmani M, Rahbar A. [Reports infestation of *Limnatis nilotica* (leech) in sheep, cattle, dogs and donkeys in the city of Dehloran. Sixth National Conference Veterinar Clin Sci. Islamic Azad University of Tabriz. Tabriz-Iran. 2009 6-8 Aug; p: 648.]Persian
9. Davari MA. [A case report of ophthalmorrhagia caused by leech attachment. *J Birjand Univ of Med Sci.* 2008; 14(3): 71-5.]Persian
10. Yaghmaee M. [An abnormal vaginal bleeding at causes of leech. *Zahedan J Res Med Sci.* 2000; 3(1): 41-3.]Persian
11. Abdi Goodarzi M, Valizadeh M, Karimi Gh R, Sakhaee D. [Case report of human infestation leech (Hirudinida family) in ten rural of Chenark of Karaj. Sixth National Conference and The First Regional Congress of Parasitology and Parasitic Diseases. Karaj-Iran. 2008 7-9 Jun; p: 433.]Persian
12. Kazemi A, Bajoghli SH. Two case report alimentary hemorrhagic in children with leech. *J Res Med Sci.* 2002; (8)4: 95-6.
13. Alcelik T, Cekic O, Totan Y. Ocular leech infestation in a child. *Am J Ophthalmol.* 1997 Jul; 124(1): 110-12.
14. Ghasemi-pirbalouti AA. [Third listen: plants, traditional medicine and ethnoveterinary, 1 edition, Medicinal and aromatic plant. Shahrekord: Saman-Danesh Pub. 2009; p: 158-90.]Persian
15. Al-Hadrani A, Debry C, Faucon F, Fingerhut A. Hoarseness due to leech ingestion. *J Laryngol Otol.* 2000 Feb; 11(4): 145-6.
16. Fazlara A, Nabipoor F, Fardesfahani P, Mohtasebi M, Zarinbakhsh KH, Mosavisajad S, et al. [Information and application of veterinary drugs. Tehran: Faculty of Scientific Evaluation of Daroupakhsh. 2000; p: 443.]Persian
17. Adib A, Ghafghazi T, Hajhashemi VA. [Medicinal pharmacology. All listen, Tehran: Mani Pub. 1998; p: 1-730.]Persian
18. Ballivet M, Alloïd C, Bertrand S, Bertrand D. Nicotine acetylcholine receptors in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol.* 1996 May; 258(2): 261-9.
19. Narahashi T, Fenester C, Quick MW, Laster RA, Marszalec W, Aistrup GL, et al. Symposium overview: mechanism of action of nicotine on neuronal acetylcholine receptors, from molecule to behavior. *Toxicol Sci.* 2000 Oct; 57(2): 193-202.

20. Alexander H, Glassman MD. Nicotine safety and toxicity. *Toxicol Sci.* 1999; 340: 573-4.
21. Chen MG, Mott KF. Progress of assessment of morbidity due to fasciola hepatica: in fection a review of recent literature. *Trop Dis Bull.* 1990; 87: 1-38.
22. Loutan L, Bouvier M, Roujanawisut B, Stalder H, Rouan MC, Buescher G. Single treatment of invasive fascioliasis with triclabendazole. *Lancet.* 1989 Aug; 2(8659): 383.
23. Ripert C, Couprie B, Moyou R, Gaillard F, Appriou M, Tribouly-Duret J. Therapeutic effect of triclabendazole in patient with paragonimiasis in Cameroon: a pilot study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 Jul-Aug; 86 (4): 417.
24. Haycox CL, Odland PB, Clotrea MD, Raugi GJ. Indications and complications of medicinal leach therapy. *J Am Acad Dermatol.* 1995; 33: 1053-5.
25. Vera C, Blu A, Torres M. [Leeches, today and yesterday present parasites in Spanish. *Rev Chilena Infectol.* 2005 Mar; 22(1): 32-7.] Spanish
26. Willis RB. Hirudin and the role of thrombin: lessons from leeches. *Trends Pharm Sci.* 1988 Dec; 9(13): 425-7.